

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 62-065692

(43)Date of publication of application : 24.03.1987

(51)Int.Cl.

C12P 17/06
// (C12P 17/06
C12R 1:465)

(21)Application number : 60-207327

(71)Applicant : SS PHARMACEUT CO LTD

(22)Date of filing : 19.09.1985

(72)Inventor : MATSUMOTO MASARU
KAWAHARA RYUICHI

(54) PRODUCTION OF LEPTOMYCIN A

(57)Abstract:

PURPOSE: To obtain leptomycin A useful as a carcinostatic agent, antibiotic substance or agricultural chemical, by culturing Streptomyces pactum S48727 (FERM P-8117) or its mutant.

CONSTITUTION: The objective leptomycin A can be produced by inoculating Streptomyces pactum S48727 (FERM P-8117) or its mutant in a liquid medium containing glucose, starch, yeast extract, meat extract, polypeptone, magnesium sulfate, sodium chloride, calcium carbonate, etc., and culturing the microorganism in the medium.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

⑩ 日本国特許庁(JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報(A)

昭62-65692

⑬ Int. Cl.⁴

識別記号

庁内整理番号

⑭ 公開 昭和62年(1987)3月24日

C 12 P 17/06
//C 12 P 17/06
C 12 R 1:465)

7732-4B

審査請求 未請求 発明の数 1 (全7頁)

⑮ 発明の名称 レプトマイシンAの製造法

⑯ 特 願 昭60-207327

⑰ 出 願 昭60(1985)9月19日

⑱ 発 明 者 松 本 勝 千葉県印旛郡富里町日吉台4-3-2-2-509

⑲ 発 明 者 川 原 隆 一 東京都墨田区業平1-6-3-917

⑳ 出 願 人 エスエス製薬株式会社 東京都中央区日本橋浜町2丁目12番4号

㉑ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

明 細 書

1. 発明の名称

レプトマイシンAの製造法

2. 特許請求の範囲

1. ストレプトミセス バクタム S48727 (微工研菌密第8117号)又はその変異株を培養し、該培養物中からレプトマイシンAを採取することを特徴とするレプトマイシンAの製造法。

2. 培養が培地1g当たり0.0008~0.8gのCu²⁺の存在下行なわれるものである特許請求の範囲第1項記載のレプトマイシンAの製造法。

3. 培養物のpHを6.5~8.5の間に調整する特許請求の範囲第1項記載のレプトマイシンAの製造法。

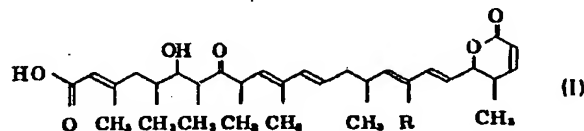
3. 発明の詳細な説明

〔産業上の利用分野〕

本発明は、抗癌剤及び抗生物質、または農薬として有用なレプトマイシンAの製造法に関する。

〔従来の技術〕

レプトマイシンAは、下配式(II)において、Rがメチル基で表わされる化合物であり、ストレプトミセス エスビー ATS 1287株の菌体及び培養液中に生産されることが知られているものである(別府輝彦ら、ジャーナル・オブ・アンチバイオテクス(THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS)、36巻、639~650頁(1983年))。



〔発明が解決しようとする問題点〕

しかしながら、レプトマイシンAはレプトマイシンB(II)式中、Rがエチル基の化合物)の微量成分として生産され、その生産量は培養液75g当たり30mgと極めて低く、しかも両者の構造が極めて近似しているため培養液中からレプトマイシンAを単離することは非常に困難であつた。

〔問題点を解決するための手段〕

本発明者らはレプトマイシンAを有利に製造すべく種々検討を行なつた結果、先に本発明者らが福島県双葉郡浪江町の土壤中から分離した微生物がレプトマイシンAを生産し、しかもレプトマイシンBは全く生産されないことを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明はストレプトミセス バクタム 848727 又はその変異株を培養し、該培養物中からレプトマイシンAを採取することを特徴とするレプトマイシンAの製造法を提供するものである。

本発明方法で用いる微生物ストレプトミセス バクタム 848727 は、ピエリシジン群の生理活性物質SS48727B及びEを産生する新規有用な微生物として本発明者らが先に見出したものであり（特願昭60-50302号及び同60-134724号参照）、工業技術院微生物工業技術研究所に受託番号微工研菌寄第8117号（FERM P-8117）として既に寄託済みである。この微生物の菌学的性質を示せば次の通りである。

(3)

(1) 形 態

各種寒天培地で10～14日間、28℃で培養し、848727株の形態を光学顕微鏡あるいは電子顕微鏡で観察した結果以下の特徴を示した。

気菌糸より胞子形成菌糸が単純分枝し、その先端部はらせん形である。輪生糸は認められない。成熟した分生胞子は、10個以上が連鎖し、胞子の形は、短円筒形～楕円形で、その大きさは、 $0.5 \sim 0.8 \times 0.7 \sim 1.4 \mu\text{m}$ である。胞子表面構造は、毛状である。胞子のり、鞭毛胞子、菌核はいずれも認められない。また、基中菌糸の分断も認められない。

(2) 各種寒天培地における生育状態

848727株の各種培地での生育状態は次表のとおりである。観察は28℃、14日間培養後に行なつた。なお、色の記載は日本色研事業協発行（昭和56年）「色名小事典」の系統色名で行つた。また、表中括弧内は色価番号を示す。

(4)

培 地	生 育	気 菌 糸		裏 面 の 色	可 溶 性 色 素
		形 成	色		
シュクロース・硝酸塩 寒天培地	微弱	貧 弱	明るいブラウンみのグレイ (207)	無 色	な し
グリコース・アスパラギン 寒天培地	中程度	貧 弱	明るいグレイ (206)	うすい黄 (67)	な し
グリセリン・アスパラギン 寒天培地 (ISP Ⅴ 5)	良 好	貧 弱	白色 (202)	うすい黄 (67)	な し
スターチ寒天培地 (ISP Ⅴ 4)	良 好	良 好	明るいブラウンみのグレイ (207)～明るいグレイ (206)	あさい黄みのブラウン (47)	な し
チロシン寒天培地 (ISP Ⅴ 7)	良 好	良 好	明るいブラウンみのグレイ (207)	黄みのブラウン (50)	な し
栄養寒天培地	良 好	な し	—	あさい黄みのブラウン (47)	な し
イースト・麦芽 寒天培地 (ISP Ⅴ 2)	良 好	中程度	白色 (202)～明るいブラ ウンみのグレイ (207)	黄みのブラウン (50)	な し
オートミール寒天培地 (ISP Ⅴ 3)	良 好	良 好	明るいブラウンみのグレイ (207)	うすい黄 (67)～ 明るい緑みの黄 (72)	な し
グリセリン・硝酸塩 寒天培地	微弱	貧 弱	明るいブラウンみのグレイ (207)	うすい黄 (67)	な し
リンゴ酸・石灰寒天培地	微弱	貧 弱	明るいグレイ (206)	無 色	な し

(5)

(3) 生理的性質

- ① 生育温度範囲(イースト・麦芽寒天培地、
14日間培養)

生育至適温度 26~34℃

生育可能温度 18~37℃

- ② セラチンの液化 陽 性
③ スターチの加水分解 陽 性
④ 脱脂牛乳の凝固 陽 性
脱脂牛乳のペプトン化 陽 性
⑤メラニン様色素の生成 陰 性
⑥ 硝酸塩の還元 陰 性
⑦ セルロースの分解 陰 性

(4) 炭素源の同化性(ブリッドハム・ゴッドリーブ寒天培地、28℃、14日間培養)

D-グルコース、ラフィノース、ガラクトースを利用し、サリシンも微弱に利用する。L-アラビノース、D-キシロース、D-フラクトース、シユクロース、イノシトール、L-ラムノース、D-マンニツト、セルロース、ラクトース、D-ソルビトール、D-マンノース、イ

(6)

19巻、391頁(1969年)、同22巻、265頁(1972年)及び「バーヂーズ・マニユアル・オブ・デターミネイティブ・バクテリオロジー(Bergey's Manual of Determinative Bacteriology)」第8版より検索した結果、S48727株は、ストレプトミセス バクタムに属する一菌株であると同定された。

次に叙上の微生物を培養し、レプトマイシンAを製造する方法について説明する。

まず、ストレプトミセス属に属するS48727株は通常の放線菌の培養法により培養される。栄養培地としては、資化しうる炭素源、窒素源、無機物などを適当に含有する限り、合成培地、半合成培地あるいは天然培地のいずれでも使用可能である。炭素源としては、例えばグルコース、ラフィノース、澱粉等が単独または組合せて用いられる。更に菌の資化性によつては、炭化水素、アルコール類、有機酸も用い得る。窒素源としては、無機もしくは有機窒素化合物、例えば塩化アンモニウム、硫酸アンモニウム、硝酸アンモニウム、

(8)

ヌリンは利用しない。

(5) 全菌体中のシアミノピメリン酸

全菌体中のシアミノピメリン酸を分析した結果、LL-シアミノピメリン酸を検出した。

以上の形態的特徴及びLL-シアミノピメリン酸を含むことより、S48727株は、ストレプトミセス属に属する一菌株であると判断される。

S48727株の菌学的性質を要約すると、次のようになる。気菌糸の先端はらせん形で、その分生胞子は10個以上の胞子が連鎖しその個々の胞子表面は毛状である。気菌糸の色調はグレーカラーシリーズ、裏面の色は無色からイエローまたはブラウンで、オートミール寒天培地ではグリーンがかつたイエローを認める。可溶性色素は認められず、メラニン様色素も生成しない。

以上の諸性質をもとに、ジャーリングとゴッドリーブのIBP報告「インターナショナル・ジャーナル・オブ・システムマチック・バクテリオロジー(International Journal of Systematic Bacteriology)」第18巻、69頁、279頁(1968年)、同

(7)

尿素、硝酸ナトリウム、グルタミン酸ナトリウム等、または天然物、例えば大豆粉、酵母エキス、ペプトン、肉エキス、乾燥酵母、綿実粕、プロテオースペプトン、カザミノ酸、コーン・ステイブ・リカー等が単独または組合せて用いられる。無機物としては、例えば炭酸カルシウム、塩化ナトリウム、硫酸銅、硫酸マンガン、硫酸亜鉛、硫酸鉄等が単独または組合せて用いられる。その他、S48727株の発育を助けレプトマイシンAの生産を促進する物質あるいはシリコン油またはアデカノール(商品名)等の一般的消泡剤を適宜培地に添加することもある。培養法としては、一般の抗生物質の生産に用いられる方法が採用されるが、液体培養法、特に深部攪拌培養法が最も適している。培養は好気的条件下で行なわれ、培養に適当な温度は26~34℃であるが、一般に27℃付近で培養するのが好ましい。また、このうち深部攪拌培養法においては、培養時に培養液のpHが上昇するので、硫酸あるいは有機酸などの酸性物質により培養液のpHをpH6.5~8.5に調整

(9)

維持することが好ましい。また、レプトマイシン A の収率を上げる目的には $0.0008 \sim 0.8 g/l$ の Cu^{2+} を加え培養することが好ましい。レプトマイシン A は振盪培養、深部攪拌培養法のいずれの場合にもその生産量は 3～5 日間の培養で最高に達する。次いで培養液中のレプトマイシン A の蓄積量が最高に達した時に培養を停止し、培養液中から目的物質を単離して精製する。

培養液中からのレプトマイシン A の単離は、後記実施例に示す如く、レプトマイシン A の理化学的性状を考慮して種々の方法を単独で、あるいは適宜組合せることによつて行なわれる。すなわち、レプトマイシン A は通常培養濾液及び菌体中に存在するので培養液を遠心分離または濾過等によつて菌体を分離し、その菌体及び培養濾液から通常の方法、例えば溶媒抽出法、イオン交換樹脂法、ゲル濾過法、吸着または分配カラムクロマト法、高速液体クロマト法、透析法、沈澱法などを単独で、または適宜組合せてレプトマイシン A を分離・精製する。

(10)

せば不純物は除去できる。

以上の如くして得られた淡黄色油状物質は、下記の理化学的性質より、レプトマイシン A と一致することが一目瞭然である（別府輝彦ら、ジャーナル・オブ・アンチバイオテクス（THE JOURNAL OF ANTIBIOTICS）、36 巻、639～650 頁（1983 年））。

<理化学的性質>

① 紫外線吸収スペクトル

$\lambda_{\text{Max}}^{1\%1\text{cm}}$ (e) nm, 225(19000)

243 (sh 17000)

② 赤外線吸収スペクトル (KBr 法)

第 1 図

③ マススペクトル (FAB-MS)

m/z 527 (M+H)⁺

④ ¹³C-NMR スペクトル (225 MHz)

重クロロホルム溶液中 TMS を基準物質と

して測定した。

δ (ppm): 2149(s), 1710(s), 1642(s), 1609(s), 1514(d), 138.6(d), 136.4(s), 135.2(d), 1310(d), 1295(s), 1281(d),

(12)

好ましい分離・精製の例としては、次の方法が挙げられる。醗酵を終了した培養液を遠心分離し、培養濾液と菌体に分ける。菌体はアセトン、メタノール等適当な溶媒で抽出し、これを減圧下に濃縮して溶媒を除き水溶液とする。前述の菌体を処理して得られた濾液とともに、pH7 前後で適当な溶媒、例えば酢酸エチル等で抽出する。抽出液の溶媒を留去し、n-ヘキサンあるいは石油エーテルで洗った後、残渣をシリカゲルカラムクロマトグラフィーに付す。次に適当な溶離液、例えばクロロホルム・メタノール混液等で溶出すると、レプトマイシン A 画分が得られる。更に、レプトマイシン A 画分の溶媒を留去した後、残渣をセファデックス LH 20 (ファルマシア社製) カラムクロマトグラフィーに付す。更に適当な溶離液、例えばメタノールあるいはクロロホルム・メタノール混液等で溶出・精製すれば、レプトマイシン A が淡黄色油状物質として得られる。もしこれまでの操作において不純物の混入がある場合には、調製用高速逆相液体カラムクロマトグラフィーに付

(11)

1279(d), 1233(d), 1200(d), 1169(d), 812(d), 743(d), 468(d), 457(d), 457(t), 407(t), 336(d), 334(d), 322(d), 207(q), 203(q), 186(q), 160(q), 135(q), 130(q), 127(q), 122(q).

なお本発明方法においては、上記 S48727 株はもとより、その人工変異株あるいは自然変異株であつてもレプトマイシン A を生産する能力を有するものであればすべて利用することができる。上記 S48727 株の人工変異株は、他の放線菌の場合と同様、例えば紫外線照射、コバルト 60 照射、化学変異誘起剤処理等により容易に得ることができる。

〔作用〕

次に斯くして得られたレプトマイシン A の生物学的性質を示す。

① 抗腫瘍作用

レプトマイシン A のマウス白血病 P-388 に対する治療効果を下記方法により試験した。結果を第 1 表に示す。なお、表中の延命効果は無処置群の生存日数 (C) に対する治療群の生存日

(13)

数(T)の比を百分率をもつて表わした。

実験方法： 1×10^8 個の P-388 細胞を CDF₁ マウス(♂、日本チャールズ・リバー)の腹腔内に移植し、24時間後よりレプトマイシンAを1日1回、計10回腹腔内に投与した。

(結果)

第1表

レプトマイシンAの投与量 ($\mu\text{g}/\text{kg}/\text{日}$)	抗腫瘍活性 T/C(%)
0.9	139
1.8	158
3.75	144
7.0	144
15.0	86

(発明の効果)

仮上の本発明方法によれば従来方法に比べレプトマイシンAの収量が増え、また培養物中からのレプトマイシンAの単離精製も簡単である。また、本発明方法において、 Cu^{2+} の存在及びpHの調

(14)

分、通気量18ℓ/分で4日間培養した。培養の際培養液のpHを酢酸により7.5に調整した。

(調) 得られた培養液を遠心分離することにより菌体と培養液とに分離し、菌体はメタノール5ℓを加え攪拌濾過し、得られた濾液を40℃で約1/10倍まで減圧濃縮した。先の培養液と合せて酢酸エチル20ℓで2回抽出し、抽出液を40℃で減圧留去し油状の粗抽出物を得た。この粗抽出物をn-ヘキサンで洗って得られた油状の粗抽出物20.5gをシリカゲル(メルク社製 Kieselgel 60, 230~400メッシュ)カラムクロマトグラフィー4.0(φ)×50cmに付し、クロロホルム/メタノール(99:1)混液2ℓで溶出すれば、本菌株が同時に生産するピエリジンA₁(Plericidin A₁)が速やかに溶出される。更にクロロホルム/メタノール(98:2)混液で溶出すればレプトマイシンA画分が溶出されるが、本菌株が同時に生産するS848727B及びS848727Eは溶出されない。更にレプトマイシンA画分をセファデックスLH20(フ

(16)

整、維持の下に通気攪拌培養を行えば収量が従来方法の40倍以上となる優れた方法である。

(実施例)

次に実施例を挙げ、本発明を説明するが本発明はこれら実施例により限定されるものではない。

実施例1

(I) グルコース1%、溶性澱粉1%、ポリペプトン0.5%、肉エキス0.5%、酵母エキス0.3%、塩化ナトリウム0.3%、硫酸マグネシウム0.1%及び炭酸カルシウム0.3%の組成を有する液体培地(基本培地)に $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を0.015g/ℓに加え、pH7.0とし500ml容坂口フラスコに100ml分注して滅菌する。これにストレプトミセス バクタム S48727株(農工研菌第8117号)を接種し、27℃で2日間培養し種培養液を調製した。

(II) 上記基本培地に、 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ を0.015g/ℓに加えpH7.0とし、30ℓ容ジャーファメンターに18ℓ仕込み滅菌した。これに、前記種培養液を2%接種し、27℃、回転数350回転/

(15)

アルマシア社製)カラムクロマトグラフィー(3.0(φ)×50cm)に付し、メタノールで溶出すると、他の不純物とよく分離して淡黄色油状のレプトマイシンA350mgを得た。従つて、培養液18ℓ当り、レプトマイシンA350mgを得たことになる。なお、本菌株はレプトマイシンBを生産しなかつた。

得られたレプトマイシンAは前記した理化学的性質を有していることを確かめた。

実施例2

実施例1(I)の基本培地に各濃度の硫酸銅を加え、pH7.0とし500ml容坂口フラスコに100ml分注して滅菌する。これにストレプトミセス バクタム S48727株を接種し、27℃で5日間培養し、レプトマイシンAの生産量と Cu^{2+} の濃度との関係調べた。この結果を第2表に示す。なお、レプトマイシンAの定量条件(高速液体カラムクロマトグラフ法による)及び試料の調製方法は次の通りである。

(定量条件)

(17)

カラム：ケムコパック社製、ヌクレオジル

5C18, 4.6(φ)×250mm

溶離液：アセトニトリル-水-酢酸(70
:30:1)(v/v/v)

流速：1.0 ml/min

検出法：UV, 240nm

チャートスピード：2.5 mm/min

(試料の調製法)

培養液 10ml を遠心分離することにより菌体と培養液に分離し、菌体はメタノール 5 ml を加え攪拌濾過し、得られた濾液を 40℃ で約 1/10 容まで減圧濃縮する。先の培養液と合わせて酢酸エチル 20ml で 2 回抽出し、抽出液の溶媒を減圧留去した後、メタノール 5 ml を加え試料溶液とする。

以下余白

(18)

更に、上記培地を 30 l 容ジャーフアメンターに 18 l 仕込み波倒した。これに、前配種培養液を 2% 接種し、27℃、回転数 350 回転/分、通気量 18 l/分 で 4 日間培養した。培養の際培養液の pH を酢酸により各々調整維持することにより pH とレプトマイシン A 生産量の関係調べた。レプトマイシン A の定量法及び試料の調製法は、実施例 2 に従った。

(結果)

第 3 表

pH	レプトマイシン A 生産量 (mg/l)
6.0	0
6.5	5.2
7.0	30.0
7.5	48.0
8.0	40.5
無修正	0

(結果)

第 2 表

Cu ²⁺ 濃度 (g/l)	レプトマイシン A 生産量 (mg/l)
無添加	0.8
0.0008	1.0
0.004	6.5
0.015	10.6
0.026	15.0
0.077	11.0
0.254	9.5
0.76	2.0

実施例 3

実施例 1 (i) の基本培地に CuSO₄ · 5H₂O を 0.015g/l 加え、pH 7.0 とし 500ml 容坂口フラスコに 100 ml 分注して波倒した。これにストレプトミセス バクタム S48727 株(疫工研菌第 8117 号)を接種し、27℃で 2 日間培養し種培養液を調製した。

(19)

第 1 図は本発明方法により得られたレプトマイシン A の赤外線吸収スペクトルである。

以上

出願人 エスエス製薬株式会社

代理人 弁理士 有賀三幸

弁理士 高野登志雄

弁理士 小野信夫

